

COLLAGEN FILM FOR MEDICAL TREATMENT

Patent number:	JP2000093497
Publication date:	2000-04-04
Inventor:	HATTORI HIROYUKI; MATSUDA KAZUHISA
Applicant:	NISSHO KK
Classification:	
- international:	A61L27/00
- european:	
Application number:	JP19980264891 19980918
Priority number(s):	JP19980264891 19980918

Abstract of JP2000093497

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a collagen film for medical treatment which solves all of the suture strength, sufficient biadaptability and the lack of tissue regeneration acceleration performance which are the drawbacks associated with the conventional collagen films for medical treatment.

SOLUTION: This collagen film for medical treatment is formed by covering at least one surface of a nonwoven fabric layer consisting of crosslinked collagen fibers with a collagen coat. The coat layer promotes the tissue regeneration of the transplanted defect sections, etc., by exhibiting the properties, such as a hemostatic effect and adhesion, propagation and expansion of cells which are the advantages of collagen. The nonwoven fabric layer exists as the skeleton for supplementation, prosthesis and seal of the defect section, etc., until the tissue regeneration of the in-vivo defect sections, etc., is completed. The nonwoven fabric layer is completely decomposed and absorbed like the coat layer after maintaining the film strength for the specified period after the suture and fixation.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-93497

(P2000-93497A)

(43) 公開日 平成12年4月4日(2000.4.4)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

ターコード(参考)

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

V 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平10-264891

(22) 出願日

平成10年9月18日(1998.9.18)

(71) 出願人 000135036

株式会社ニッショー

大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号

(72) 発明者 服部 博行

大阪市北区本庄西3丁目9番3号株式会社

ニッショー内

(72) 発明者 松田 和久

大阪市北区本庄西3丁目9番3号株式会社

ニッショー内

Fターム(参考) 4C081 AB11 AC03 BA11 BA12 BA16

BB04 BB08 BC02 CC04 CC05

CC06 CD121 CD131 DA02

DA05 DB01 DB03 DC02 DC03

EA02

(54) 【発明の名称】 医療用コラーゲン膜

(57) 【要約】

【課題】 従来の医療用コラーゲン膜の欠点であった縫合強度および十分な生体適合性、組織再生促進性能の不足という点を全て解決した医療用コラーゲン膜を提供すること。

【解決手段】 架橋したコラーゲン繊維からなる不織布層の少なくとも一面が、コラーゲン被膜で覆われてなる医療用コラーゲン膜であって、被膜層は、コラーゲンの特長である止血作用、細胞の接着・増殖・伸展といった性質を発揮して、移植された欠損部位等の組織再生を促し、不織布層は、これら生体内欠損部位等の組織再生が完了するまでの間、欠損部位等を補填、補綴、シールする骨格として存在し、縫合固定後の一定期間その膜強度を維持した後、被膜層と同様に全て分解、吸収される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 架橋したコラーゲン繊維からなる不織布層の少なくとも一面が、コラーゲン被膜で覆われてなる医療用コラーゲン膜。

【請求項 2】 不織布を構成するコラーゲン繊維の断面の直径が10～1000 μm である請求項 1 記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 3】 コラーゲン被膜が多孔性コラーゲンからなる請求項 1 または 2 記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 4】 不織布層が、架橋したコラーゲン繊維と該繊維間隙がコラーゲンで充填されてなる請求項 1～3 のいずれかに記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 5】 コラーゲンが、酵素可溶化コラーゲン、酸可溶化コラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、中性可溶化コラーゲンから選ばれた少なくとも 1 である請求項 1～4 のいずれかに記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 6】 多孔性コラーゲン被膜が凍結乾燥することによって得られる請求項 1～5 のいずれかに記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 7】 コラーゲン被膜が架橋されてなる請求項 1～6 のいずれかに記載の医療用コラーゲン膜。

【請求項 8】 不織布層中に充填されたコラーゲンが架橋されてなる請求項 1～7 のいずれかに記載の医療用コラーゲン膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医療用コラーゲン膜に関するものであり。詳しくは生体組織代替膜として、胸膜、心膜、脳硬膜、漿膜などの生体内膜状組織および各種臓器などの欠損部または切断面への補填、補綴などに利用され、特に縫合可能であり、なおかつ生体適合性が良好であり、さらに組織再生の促進を誘導することができる医療用コラーゲン膜に関するものである。

【0002】

【従来の技術】一般的な外科手術においては、患部の切除、および損傷部分の修復等を行う場合が多く、特に肺、心臓、肝臓、脳などの各種臓器を対象とする場合には、その切断面や欠損部などに組織を覆っている膜状物を補填または補綴しなければ、その臓器の根本的な機能を損なう場合が多い。これらの処置を不完全に行うと、臓器の機能不全により死亡するか、もしくは生命の危機を逃れても、予後が大変悪くなる傾向が多く見られる。このような臓器や組織の機能不全を防止する目的で、臓器または組織を覆う膜状物が様々な材料により開発されている。

【0003】現在、胸膜、心膜、脳硬膜、漿膜などの生体内膜状組織の代表的な代替膜としては、合成繊維を利用したもの、動物および人の組織を利用したもの、また各種ゼラチン、コラーゲンなどの生体由来材料を利用したものなどが知られている。これらの各種材料を利用し

た代替膜は、それぞれの材料に由来した特性から優れた長所があるものの、その一方で相反する短所も抱えており、全ての条件を満足する代替膜は未だ存在していない。

【0004】例えば、合成繊維を利用した代替膜は、生体吸収性・非吸収性の材料の如何にかかわらず、目的部位への縫合固定が可能な程度に機械的強度は優れているが、その反面合成物であるが故に体内で異物として認識され、皮包化が高頻度で発生するなど生体適合性の面で十分に満足する結果が得られていない。また、動物や人の組織を利用したものは、機械的強度はほぼ満足し、生体適合性もやや良好ではあるが、結局は異種組織であり、移植された側には拒絶反応の点を完全に否定できず、石灰化などの例が報告されている。また、人屍体の組織を利用することは、倫理的、数量的にも供給源としての問題がある上、近年 CJD (Creutzfeldt - Jacob Disease) が報告され、社会問題にもなっている。一方、医療安全性や生体適合性の観点から見た場合、自己の筋膜等の自己組織を利用することが一番理想的ではあるが、これは対象となる患者本人の状況から必ずしも採取できるものではなく、仮に採取可能であるとしても大量に採取する事が不可能である上、患者本人に非常な苦痛を強いるといった大きな問題がある。

【0005】このような事情により、各種ゼラチン、コラーゲン、ヒアルロン酸と言った生体由来材料によって、自己組織に近い性能を持つ膜状物を実用化しようとする様々な試みが成されてきた。例えば、ヒアルロン酸を利用したものとして、特表平7-502431号公報が挙げられるが、この発明はヒアルロン酸を合成もしくは半合成経路によりエステル化したものを主原料としている為、純粋な生体由来材料とはいえず、組織再生において生体適合性の観点から十分でなかった。

【0006】また、動物、もしくは人組織を利用したものとしては、特表平9-502371号公報、特開平9-122227号公報、特開平7-116242号公報などが挙げられる。しかし、人組織を利用する場合には、いずれも前述の CJD 等の感染性の問題を完全には否定できない上、人組織を精製した膜では縫合に耐えうる強度は得られていない。唯一これらの特許の中では、特開平7-116242号公報のみが、外科手術における縫合を可能とした旨の記述があるが、これはポリグリコール酸等の合成繊維を利用することにより達成されたものであり、合成成形品を使用する際における前述の医学的デメリットは解消されていない。

【0007】一方、合成成形品と動物由来のコラーゲンを組み合わせる様々な加工を施し、医用材料としての膜強度、繊維状物の強度を向上する試みがなされている。これらの技術としては、特開平1-131666号公報、特公平7-87850号公報、特開平7-178131号公報、特開平10-113384号公報など多数存在する。しかし、これらは如

何に十分な縫合強度を確保しえたとしても、前述の通り合成成形品を使用している以上、体内埋植時における異物反応・皮包化などの医学的デメリットから逃れることはできないため、理想的な医用代替膜になりにくい。この他にも同様の技術として特開平7-194689号公報、特開平6-292716号公報などが公開されているが、縫合強度、生体適合性、組織再生の誘導の3点において、その全てを十分に満足するとはいいにくい。

【0008】このような合成成形品を利用したものに対して、動物由来のコラーゲンのみを利用した医療用膜がある。例えば、特表昭59-501319号公報、特公昭61-34798号公報、特開平5-105624号公報、特開平5-253285号公報、特表平7-501004号公報、特表平7-509143号公報、特開平8-52204号公報、特開平9-31334号公報、特開平6-304240号公報、登録特許第2607266号公報などが知られている。このうち、特表平7-509143号公報には、歯科領域において縫合可能な強度を達成するに至った旨の記載が存在するが、架橋剤等を使用したコラーゲンの面が直接生体に接触するため、生体適合性、組織再生促進の誘導などで問題があった。

【0009】また、登録特許第2607266号公報には、定性的に動物への移植時に縫合が可能な医用材料の技術を紹介している。この特許は、架橋剤として生体内物質であるケトース等を使用する事により、生体への安全性を重視し、さらに埋植実験でも生体適合性が良好であることを示している。しかし、これら生体に接触される膜状物の表面は、架橋剤を使用しているため生体適合性と組織再生促進の誘導の観点から問題があった。また、登録特許第2610471号公報には、コラーゲンの多孔性スポンジを得る技術が紹介されている。この特許により得られるコラーゲン多孔性スポンジは、生体適合性および組織再生促進の誘導の観点からは良好であるが、スポンジの強度的な問題から縫合固定は不可能である。さらに、これらの特許以外には、特表平4-500954号公報、特表平3-503371号公報、特公平5-49303号公報、特公平8-11121号公報、特公平4-21496号公報などがあるが、これらも縫合強度、生体適合性、組織再生の誘導の3点において、その全てを十分に満足するとは言いにくい。

【0010】また、これらと同様に動物由来コラーゲンのみを使用し、不織布状に加工する事により膜状物の強度を向上する技術としては、特開昭50-141190号公報、特公昭51-42234号公報、特公昭62-34880号公報などが存在する。しかし、これらはいずれも、創傷被覆材・皮膚代用膜としての目的で開発されたものであり、縫合を前提とした用途への配慮は無く、いずれもコラーゲンの線維化、架橋剤による架橋処理を実施してはいるものの、縫合を必要とする外科手術に耐えるものではない。また、耐水性を付与する目的で架橋剤等の薬品で処理されており、この被処理面が直接生体に接触するなど、生体適合性と組織再生の誘導に関する配慮が欠けている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】これらのコラーゲンを使用した医療用膜は、いずれもコラーゲン膜の縫合強度および十分な生体適合性、組織再生促進性能が不足しているという問題を有していた。本発明の目的は、従来の医療用コラーゲン膜の欠点であった縫合強度および十分な生体適合性、組織再生促進性能の不足という点を解決した医療用コラーゲン膜を提供することである。本発明者等は、かかる従来の医療用コラーゲン膜の欠点を解決するために鋭意研究した結果、架橋したコラーゲン繊維からなる不織布層とコラーゲン被膜とからなる積層構造のコラーゲン膜を形成することによって、本発明の課題が達成されることを見出し本発明に到達した。

【0012】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は架橋したコラーゲン繊維からなる不織布層の少なくとも一面が、コラーゲン被膜で覆われてなる医療用コラーゲン膜である。また、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、不織布を構成するコラーゲン繊維の断面の直径が10～1000 μm である医療用コラーゲン膜である。更に、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、コラーゲン被膜が多孔性コラーゲンからなる医療用コラーゲン膜である。

【0013】更にまた、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、不織布層が、架橋したコラーゲン繊維と該繊維空間がコラーゲンで充填されてなる医療用コラーゲン膜である。また、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、コラーゲンが、酵素可溶性コラーゲン、酸可溶性コラーゲン、アルカリ可溶性コラーゲン、中性可溶性コラーゲンから選ばれた少なくとも1である医療用コラーゲン膜である。更に、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、多孔性コラーゲン被膜が凍結乾燥することによって得られる医療用コラーゲン膜である。更にまた、本発明は前記医療用コラーゲン膜において、コラーゲン被膜および/または不織布層中に充填されたコラーゲンが架橋されてなる医療用コラーゲン膜である。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の医療用コラーゲン膜は、生体由来材料であるコラーゲンを主原料として作製され、不織布層と被膜層の積層構造からなる。医療用コラーゲン膜は、不織布層が被膜層との積層構造の数ヶ所にサンドイッチされた積層膜であり、その積層膜の少なくとも一面が被膜層からなる2～8層の積層構造が好ましい。不織布層は医療用コラーゲン膜が有する縫合可能な膜強度、被膜層は生体適合性および組織再生促進性能の向上に關与する。

【0015】すなわち、医療用コラーゲン膜そのものが全て生体由来材料であるコラーゲンにより構成されるため、生体適合性が優れているだけでなく、移植された生体内では除々に分解・吸収され、最終的には全て分解・

吸収される。この分解・吸収の過程において、主に被膜層は、コラーゲンの特長である止血作用、細胞の接着・増殖・伸展といった性質を発揮して、移植された欠損部位等の組織再生を促す。また不織布層は、これら生体内欠損部位等の組織再生が完了するまでの間、欠損部位等を補填、補綴、シールする骨格として存在し、縫合固定後の一定期間その膜強度を維持した後、被膜層と同様に全て分解、吸収される。不織布層もコラーゲンにより構成されているために、強度保持としての役目だけではなく、被膜層と同様に止血作用、細胞の接着・増殖・伸展といった特性を少なからず併せもっている。

【0016】本発明に使用されるコラーゲンとしては、酵素可溶化コラーゲン、酸可溶化コラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、中性可溶化コラーゲンなどが挙げられる。これら可溶化されたコラーゲンとは、例えばペプシン、トリプシンなどの蛋白質分解酵素による可溶化処理、あるいは酸・アルカリ・中性薬剤により可溶化処理されたものであって、可溶化と同時にコラーゲンの抗原決定基であるテロペプチドの除去処理を行った、通常アテロコラーゲンと呼ばれる医療用途に適するものが好適である。これらの可溶化されたコラーゲンは、牛、豚、鳥類、魚類、兎、羊、ネズミ、人、などの皮膚、腱、骨、軟骨、臓器などの動物種などから特公昭46-15033号公報、特公昭43-25839号公報、特公昭43-27513号公報などに記載の各種抽出技術により得ることができる。また、コラーゲンのタイプについては、I型、■型などの分類可能なタイプのうちのいずれかに限定されるものではないが、取り扱い上の観点からI型コラーゲンが特に好適である。また、コラーゲンを可溶化させる溶媒については水が好適である。

【0017】不織布層を構成するコラーゲン繊維は、コラーゲン水溶液をノズルから連続紡糸してコラーゲン不溶剤を収容した容器中またはコンベアーベルト上に受け、連続した繊維がランダムに配列した繊維状成形物を得る。次に、この繊維状成形物を減圧乾燥、自然乾燥、低温乾燥、送風乾燥などの方法で乾燥する。いずれの乾燥方法においてもコラーゲンの変性を防ぐため、使用するコラーゲンの変性温度以下で乾燥を行うことが重要であり、その温度は使用するコラーゲンの種類にもよるが、35℃～45℃の温度域以下が好ましい。特に低温乾燥または減圧乾燥が好ましい。一方、間欠吐出による非連続紡糸、又は通常の連続紡糸を行った後に得られた糸を切断処理することにより、連続、非連続紡糸のいずれの場合においても短いステープル状の繊維が得られる。これらを適当な大きさの容器に均一に分散させた状態で、減圧乾燥、自然乾燥などの方法により乾燥させ繊維状成形物を得ることができる。

【0018】紡糸に使用するコラーゲン水溶液の濃度は、使用するコラーゲンの種類により異なるが、通常は0.1～20wt%、好ましくは1～10wt%である。湿式紡糸

の凝固浴としては、無機塩類水溶液、無機塩類溶解有機溶媒、アルコール類、ケトン類等が挙げられる。例えば無機塩類水溶液としては、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムなどが挙げられ、特に塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムが好ましい。またこれらの無機塩類をアルコール、アセトンに溶解／分散させた無機塩類溶解有機溶媒等も利用可能であり、特に塩化ナトリウムのエタノール溶解／分散溶液は好適である。またアルコール類としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アミルアルコールなどが挙げられるが、医療用途としてはエタノールが好適である。さらにケトン類としてはアセトン、メチルエチルケトンなどがよい。以上本発明のコラーゲン不織布の製法を湿式紡糸を中心に説明したが、乾式紡糸でも製造することができる。

【0019】本発明不織布を構成するコラーゲン繊維の繊維断面直径は、10～1000 μ m、好ましくは20～500 μ m、更に好ましくは30～200 μ mである。繊維断面直径が10 μ m未満であると、医療用コラーゲン膜の強度が低くなる傾向があり、1000 μ mを超えると、膜形成が困難になる傾向がある。次いで、不織布を構成するコラーゲン繊維は、架橋処理が施される。架橋処理により、コラーゲン不織布は、湿潤時における物理的な強度が向上し、縫合に必要な強度が十分に確保できるとともに、生体内に移植された際に分解・吸収される時間が、未架橋の場合に比較して飛躍的に遅延させることができる。架橋処理された不織布は、生体の欠損部を補填または補綴し、欠損による臓器・組織等の機能不全を防止し、しかも創傷面の修復および組織の再生を完了するまでの期間、体内で必要な膜強度を維持したまま生体内に残存することができる。

【0020】架橋方法には、大別して物理的架橋方法と化学的架橋方法がある。物理的架橋架橋方法の例としては、線、紫外線、電子線、プラズマ、熱脱水架橋などが挙げられる。一方化学的架橋方法の代表例としては、ジアルデヒド、ポリアルデヒドなどのアルデヒド類、エポキシ類、カルボジイミド類、イソシアネート類、タンニン、クロムなどの処理によって繊維を架橋する。このうち、アルデヒド類としては、ホルマリン、グルタルアルデヒド、酸アルデヒド、グリオキザール、マロンジアルデヒド、スクシンジアルデヒド、フタルアルデヒド、ジアルデヒド澱粉、ポリアクロレイン、ポリメタクロレインなどが挙げられ、また、エポキシ類としては、グリセロールジグリシジルエーテル、ソルビトールジグリシジルエーテル、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテルなどが挙げられる。更に、カルボジイミド類としては水溶性カルボジイミドなどが挙げられる。また、イソシアネート類としてはヘキサメチレンジイソシアネート、トリレンジイソシ

アネートなどが挙げられる。

【0021】不織布層は、連続したコラーゲン繊維がランダムに絡み合って形成されるが、必要により絡み合ったコラーゲン繊維の間隙がコラーゲンで充填されることによって、不織布層の強度を上げるとともに、不織布層と被膜層との接着強度を上げることができる。不織布層を構成するコラーゲン繊維は、化学的架橋方法、例えばグルタルアルデヒドなどのアルデヒド類を用いた架橋を施すことによって水難溶性のコラーゲン繊維を形成することができる。このように架橋されたコラーゲン繊維からなる不織布層の片面または両面に被膜層を被覆して一体化させ、最後に熱脱水架橋を施すことによって、縫合強度、生体適合性、組織再生の誘導の優れたコラーゲン膜を得ることができる。なお、不織布層において、コラーゲン繊維間隙がコラーゲンで充填されている場合には、コラーゲン充填層も被膜層と同様に熱脱水架橋されているのが好ましい。しかし、これはあくまで一例であって、例えば全ての層を熱脱水架橋により処理しても何ら問題はなく、また、滅菌と架橋を兼ねて例えばγ線を照射しても良い。すなわち本医療用コラーゲン膜の製造工程における架橋処理は、医療用コラーゲン膜の湿潤時における物理的強度を向上させるとともに、縫合に必要な強度の確保のために必要であって、架橋方法の組み合わせ、順序等については、特に制限は無い。

【0022】更に、コラーゲン繊維状成形物は、より高い縫合強度を得るために、圧縮することによって、不織布層の繊維密度が上がり、より強度の高い膜状成形物を得ることができる。圧縮は汎用のプレス機でも実施可能であるが、医療用途を目的とすることから、十分に丈夫な滅菌済みの包装材、例えばアルミパック、高強度可撓性樹脂包装材等により無菌的に包装された状態で圧縮されることが好ましい。この際、不織布層を圧縮する圧力は、10～1000kgf/cm² が好ましい。不織布層は、可能な限り十分に圧縮され、薄層化されることによって嵩密度が大きくなり、これを積層し多層構造にすることによって、さらに縫合強度が高くなった優れた医療用コラーゲン膜になる。

【0023】本発明の医療用コラーゲン膜はコラーゲン不織布層の少なくとも一面が、コラーゲン被膜層が被覆された構造をしている。コラーゲン被膜層が多孔性コラーゲンの場合、生体内の組織細胞が孔部にまで伸びて医療用コラーゲン膜が生体組織細胞と強固に接合することができて好ましい。多孔性コラーゲン膜は、例えば可溶化コラーゲン水溶液を、平板状容器に流延し、汎用のフリーザーで十分に凍結した後、凍結乾燥機で乾燥することにより均一な多孔性コラーゲン層が得られる。この時、多孔性コラーゲン層に形成される微細な孔の孔径は、コラーゲンの濃度とその溶媒、凍結温度、凍結時間などにより調節可能である。また、多孔性コラーゲン層の厚さは、生体内に移植された場合の分解・吸収時間、

組織再生の誘導への影響を考慮して任意に調節可能である。

【0024】多孔性コラーゲン層は、コラーゲンの濃度が0.5～5wt%、好ましくは1～3wt%のコラーゲン水溶液を平板状容器に流延し、フリーザー、ディープフリーザーなどで凍結温度-196～-10℃、好ましくは-80～-10℃で凍結した後、凍結乾燥機で乾燥することによって多孔性コラーゲン層が得られる。多孔性コラーゲンの厚さは1～20mmが好ましい。医療用コラーゲン膜は、このようにして形成された多孔性コラーゲン層と不織布層とを可溶化コラーゲンなどを用いて加圧して接着するか、あるいは不織布層を凍結前の可溶化コラーゲン水溶液に浸漬させた後に凍結乾燥することにより一体化する方法で製造することができる。また、多孔性コラーゲン層のコラーゲン総量および厚さについては、対象となる欠損部、切断面などの創傷面の修復、組織再生の誘導などに支障を来さないように、おおむね1～4週間程度多孔性コラーゲン膜が体内で残存しているのが望ましい。

【0025】このようにして得られた不織布層と多孔性コラーゲン層とからなる医療用コラーゲン膜を、さらに加圧して圧縮することもできる。また、多孔性コラーゲン層単独または不織布層単独を圧縮した後に、圧縮されていない不織布層または多孔性コラーゲン層とを一体化しても良い。特に、製膜の最終工程において不織布層とスポンジ層が一体化されているものを同時に加圧して圧縮するのが好ましい。加圧して圧縮することにより膜厚が減少し、薄膜化された事によって、手術現場等において実際にコラーゲン膜を使用する際に、縫合における縫合針の貫通性、任意の形状への切断等の取り扱いが向上し、移植手術等がより円滑に行えるからである。

【0026】上記の方法により得られた不織布層または圧縮された不織布層の物理的強度をさらに向上させるために、不織布層または圧縮された不織布層に、可溶化コラーゲン水溶液を含浸させた後、自然乾燥、送風下乾燥、減圧乾燥、低温下乾燥などの適当な乾燥方法で乾燥を行うことによって、不織布層の繊維間隙をコラーゲンで充填させた医療用コラーゲン膜を製造することができる。すなわち、架橋コラーゲン繊維からなる不織布の繊維間隙がコラーゲンで充填された不織布層の両面がコラーゲン被膜で覆われた医療用コラーゲン膜である。この操作により得られた医療用コラーゲン膜は、不織布単体層の時よりもはるかに物理的強度が向上し、縫合強度も格段に向上する。なお、要求される物理的強度の程度により、この含浸・乾燥の工程を1～数10回繰り返してもよい。この際、不織布層または圧縮された不織布層に架橋処理が施されていないと、不織布層を可溶化コラーゲン水溶液に含浸した時、不織布層自身が溶解してしまうことがあるので、予め不織布層を架橋処理した後に、不織布層を可溶化コラーゲン水溶液に含浸するのが好まし

い。なお、含浸処理の他には、適当な容器に収容された不織布層に可溶化コラーゲン水溶液を流延または充填する方法や直接不織布層に可溶化コラーゲン溶液を塗布する方法もある。このようにして形成された架橋コラーゲン繊維からなる不織布の繊維間隙がコラーゲンで充填された不織布層の両面がコラーゲン被膜で覆われた医療用コラーゲン膜を前記凍結乾燥することによって、コラーゲン被膜部が多孔を有する多孔性コラーゲン層が形成される。

【0027】また、予めスポンジ状に乾燥しておいたコラーゲン層で不織布層を挟んで膜状物を得るか、もしくは多孔性コラーゲン層と不織布層を同時に圧縮し、不織布層を多孔性コラーゲン層に埋入せしめて得た多層物を、希薄な可溶化コラーゲン水溶液または水の存在下で常圧もしくは減圧下に置くことにより、可溶化コラーゲンの多孔性コラーゲン層を溶解させ、不織布層と十分になじませてから各種乾燥法で乾燥させる方法がある。この多孔性コラーゲン層を利用する方法は、不織布層の繊維間隙にコラーゲンを充填するために、実際に使用されるコラーゲン量に対して、水分などの溶媒成分が非常に少量ですむために、後工程で乾燥を行う際に短時間で済む上、乾燥時における拘縮、変形などが非常に少ないという利点がある。通常の含浸工程であれば、含浸用可溶化コラーゲン水溶液中の実質コラーゲン量は、実用的溶液粘度の関係から数%程度が限度であり、残りの90%以上は水分等の溶媒成分となるため、含浸・乾燥の操作に時間がかかるだけでなく、この操作自体を反復する必要があるために、簡便な方法ではあるが合理性に欠ける。

【0028】

【実施例】以下実施例で本発明の一例を説明する。

【実施例1】ニワトリ由来アテロコラーゲンをマグネチックスターラーでゆるやかに攪拌しながら、注射用蒸留水を添加して3wt%と5wt%濃度のコラーゲン水溶液を調製した。次に5wt%のコラーゲン水溶液40mlをディスペンサー（サンエイテック社製：EFD900型）を用いて27ゲージサイズ（孔径200 μ m）のニードル先端より2.5barの定圧条件下で99.5vol %エタノール液（和光純薬工業社製、特級）中に連続押し出し紡糸を行った。なお、連続押し出し紡糸中においては、ニードル先端をエタノール凝固浴上でランダムに移動させ、紡糸により凝固した連続コラーゲン糸が凝固浴底面に網状構造に沈降した集合体を形成した。次に、これを1時間放置して十分に凝固させた後、エタノールで2回凝固液を交換して洗浄した。

【0029】こうして得られた繊維状コラーゲンの集合体を、そのままバキュームドライオーブン（EYELA社製：VOS-300VD 型）で油回転真空ポンプ（ULVAC社製：GCD135-XA型）にて室温・減圧下（1Torr未満）で4時間乾燥させ、繊維状コラーゲン不織布を得た。次にこの不織布を滅菌済みアルミ包材に入れ、ハイプレッシャージャッ

キ（井内盛栄堂社製：15トンプレス機）にて100kgf/cm²の圧力で圧縮し、7cm×4.5cmの圧縮不織布を得た。次にこの圧縮不織布をグルタルアルデヒドの5%溶液（和光純薬工業社製、1級グルタルアルデヒド25%溶液を注射用蒸留水で希釈）に4時間浸漬させ架橋処理を行った。反応終了後に注射用蒸留水で十分に洗浄した後、注射用蒸留水浴中に1時間浸漬させ、浸漬中に水を3回交換して余剰のグルタルアルデヒドを除去した。架橋処理が完了した不織布を室温・減圧下（1Torr未満）で4時間乾燥させ圧縮した。

【0030】次に、凍結乾燥した多孔性コラーゲンを作製した。これはまず可溶化コラーゲン3wt%水溶液を型に入れ厚さ約17mmまで充填した後、フリーザー（SANYO社製：MEDICALFREEZER）にて-20℃下で12時間程凍結処理した。次に凍結した可溶化コラーゲンを容器にいったまま凍結乾燥機（EYELA社製：FDU-830 型）に移し、油回転真空ポンプ（ULVAC社製：GCD200-XA型）にて減圧下（0.05Torr未満）で約24時間凍結乾燥した。なお凍結乾燥終了時の多孔性コラーゲン層の膜厚は約15mmであった。得られた多孔性コラーゲン層と前記架橋処理圧縮不織布を重ねて100kgf/cm²の圧力で圧縮し、不織布層が多孔性コラーゲン層に埋没した約7cm×4.5cmの大きさの多層コラーゲン膜を得た。

【0031】次にこの多層コラーゲン膜を極少量約15mlの3wt%可溶化コラーゲン水溶液中に浸漬した状態でバキュームドライオーブン（EYELA社製：VOS-300VD 型）にて減圧し、多層コラーゲン膜中の空気を脱気して可溶化コラーゲン水溶液を強制的に含浸させた。こうして得られた多孔性コラーゲン層が溶解した多層コラーゲン膜を低温下（4℃）で24時間乾燥した。これを乾燥して得られた多層コラーゲン膜を容器に移し、上から可溶化コラーゲンの3wt%水溶液を注ぎ込み、多層コラーゲン膜がほぼ中間層に来るように滅菌ピンセット等で位置調整を行った後、フリーザー（SANYO社製：MEDICALFREEZER）にて-20℃下で12時間程凍結処理した。凍結したコラーゲン膜を容器にいったまま減圧下（0.05Torr未満）で約24時間凍結乾燥を行った。得られた圧縮不織布層と多孔性コラーゲン層が一体化した多層コラーゲン膜を、400kgf/cm²の圧力で圧縮し、厚さ約1.5mm、大きさ約7cm×4.5cmの3層構造の多層コラーゲン膜を得た。次に、この得られた膜を、バキュームドライオーブンと油回転真空ポンプ（ULVAC社製：GCD135-XA型）にて135℃-減圧下（1Torr未満）で12時間熱脱水架橋処理を行った。この様にして、不織布層の繊維のみがグルタルアルデヒド架橋処理された、コラーゲンのみから成る医療用コラーゲン膜を得た。

【0032】

【実施例2】実施例1と同様に、ニワトリ由来アテロコラーゲンをマグネチックスターラーでゆるやかに攪拌しながら、注射用蒸留水を添加して3wt%と5wt%濃度の

コラーゲン水溶液を調製した。次に 5 wt% のコラーゲン溶液 40 ml をディスペンサー（サンエイテック社製：EFD900 型）を用いて 20 ゲージサイズ（孔径 600 μm ）のニードル先端より 2.0 bar の定圧条件下で 99.5 vol % エタノール液（■和光特級）中に連続押し出し紡糸を行った。以下実施例 1 と同様に不織布を得た後、グルタルアルデヒド処理を同様に 4 時間行い、再び圧縮した。この様にして得られた圧縮不織布を 2 枚使用して積層構造とした。次に、実施例 1 と同様に多孔性コラーゲンをを用いて可溶化コラーゲンを各不織布層に含浸させ、4℃下で 24 時間乾燥させ多層コラーゲン膜を得た。

【0033】次にこの多層コラーゲン膜をグルタルアルデヒドの 5% 溶液（和光純薬工業社製、1 級グルタルアルデヒド 2.5% 溶液を注射用蒸留水で希釈）に 4 時間浸漬させ架橋処理を行った。反応終了後に注射用蒸留水で十分に洗浄した後、注射用蒸留水浴中に 2 時間浸漬させ、浸漬中に水を 5 回交換して余剰のグルタルアルデヒドを除去した。洗浄が完了した多層コラーゲン膜を、4℃下で 24 時間乾燥させた後、多層コラーゲン膜を容器に移し、上から可溶化コラーゲンの 3 wt% 水溶液を注ぎ込み、多層コラーゲン膜がほぼ中間層に来るように滅菌ピンセット等で位置調整を行った後、フリーザー（サンヨー社製：MEDICAL FREEZER）にて -20℃下で 12 時間程凍結処理した。凍結したコラーゲン膜を容器にいたまま前述同様に凍結乾燥を約 24 時間行なった。得られた圧縮不織布層と多孔性コラーゲン層が一体化したコラーゲン膜を、再度同様に 400 kgf/cm² の圧力で圧縮し、厚さ約 1.7 mm、大きさ約 7 cm × 4.5 cm の 4 層構造のコラーゲン膜状物を得た。次に、この得られた膜を、バキュームドライオーブンと油回転真空ポンプ（ULVAC 社製：GCD135-XA 30 型）にて 135℃-減圧下（1 Torr 未満）で 12 時間熱脱水

架橋処理を行った。この様にして、不織布層の全層がグルタルアルデヒドにより架橋処理された、コラーゲンのみから成る医療用コラーゲン膜を得た。

【0034】縫合強度の測定

実施例 1 および実施例 2 において作製したコラーゲン膜が、どの程度縫合に対する強度を有しているかの測定試験を行った。測定対象としたサンプルは、実施例 1 および 2 において作製したコラーゲン膜である。また比較例として、ゴアテックス心膜（ゴアテックス社製：ゴアテックス EPTFE パッチ■（心膜用シート））、ブタ摘出心膜およびブタ摘出脳硬膜を使用した。なおブタ摘出心膜および摘出脳硬膜は、約 20 kg のブタを麻酔下で摘出手術により各膜を取り出した後、生理食塩水に浸漬させ、新鮮な状態で直ちに測定した。測定方法は以下の通りである。まず実施例 1 および 2 の膜および比較例の膜を全て 1 cm × 2.5 cm のプレート状切片として切り出し、長辺方向の片端より 5 mm の距離で、膜の中央部に 4-0 プロリール糸（ETHICON, INC 製）を通して輪状に結節した。次にこれを 37℃ の生理食塩水中に 30 分間浸漬させた後、試料を速やかに取り出して島津社製オートグラフ S-500D により引張強度を測定した。測定条件は、4-0 プロリール糸を通した側と反対側の端を末端より約 10 mm の距離までチャックして固定し、もう一方の端にある輪状の 4-0 プロリール糸を測定フックに掛けて 10 mm/分の一定速度で引張測定した。この時、膜が 4-0 プロリール糸により切断または糸が膜より離れる時点までの強度変化を測定し、記録された強度の内での最高値を測定に使用した膜の縫合強度として採用した。表 1 に測定結果を示す。単位は N である。

【0035】

【表 1】

実施例 1	実施例 2	比較例 1	比較例 2	比較例 3
8.5	9.8	8.5	4.0	8.3

【0036】表 1 から明らかなように、本発明の実施例 1 および 2 で得られた医療用コラーゲン膜の縫合強度は比較例 2 のブタ心膜より高く、比較例 1 の市販製品および比較例 3 のブタ脳硬膜より若干優れていて実用化可能であることを示している。

【0037】埋植試験

実施例 1 で得られたコラーゲン膜を、ラット（n=8）の背部皮下に埋植して、その組織反応を肉眼と光学顕微鏡により観察し、生体適合性を評価した。埋植サンプルは、実施例 1 により得られたコラーゲン膜を、5 mm × 15 mm の大きさに切断して使用した。また比較例 4 は 3 wt% のコラーゲン水溶液を用いて、実施例 1 の多孔性コラーゲン層と同じ膜を作製し、未架橋のまま圧縮処理を行い膜状に加工した膜を前記試料と同じ大きさに切断して使用した。実施例 1、比較例 4 の膜は、いずれも 25 kGy の

γ線を照射して滅菌した後に埋植試験に使用した。埋植は、まずラット（250~300g）の腹膜内に麻酔を注射し、次に無菌的にラット背部脊髄を挟んで左右に、脊髄方向に対して並行に 2 本、約 1.0 cm ずつ切開して下部の脊髄傍筋を露出させた。次に筋膜を切開して実施例 1 膜または比較例 4 膜を切開部から側方へ向けて差し込み、切開部に膜が当たらないように左右の切開部にそれぞれ各 1 枚ずつ膜を埋植した。

【0038】なお実施例 1 膜または比較例 4 膜の埋植場所は、各ラット毎に左右を入れ替え、また埋植直前には生理食塩水を各膜に適量振りかけて湿润状態とし、柔軟性をもたせた状態で埋植した。埋植後の切開部は縫合して閉鎖した。埋植 1、2、4 週間後に麻酔下でサンプルを取り出し、そのまま麻酔薬をさらに過剰に投与して安楽死させた。実施例 1 膜または比較例 4 膜を取り出す際

には、埋植部位切開直後の埋植状態と、摘出後の状態の両方において、実施例 1 膜、比較例 4 膜とその周囲組織の状態を肉眼により観察した。また実施例 1 膜と比較例 4 膜は周囲組織と共に摘出した後、肉眼と光学顕微鏡により炎症状態やコラーゲン膜の状態を観察した。埋植後の経過は、いずれのラットにおいても 2～3 日程度で切開部の傷口がほぼ完全に治癒した。埋植した比較例 4 膜は、1 週間後には既にほとんど分解・吸収されており、周囲組織には肉眼で特に炎症反応は見受けられず、線維性の癒痕も見られなかった。光学顕微鏡による観察では、比較例 4 膜らしきものの周囲組織に極僅かな巨細胞の分布が見られた。埋植 2、4 週間後には肉眼的また触診によりコラーゲン膜の残存は確認できず、炎症反応も全く見受けられず、線維性の癒痕も無かった。また、光学顕微鏡による観察でも埋植周囲組織に巨細胞等の集合は見られなかった。

【0039】一方、実施例 1 膜の方では、埋植 1 週間後においては、肉眼により膜の存在がはっきりと確認でき、触診によっても形状が保持されている事がわかる程度であった。炎症反応は肉眼では特に認められず、線維性の癒痕も見あたらなかった。光学顕微鏡による観察でも特に顕著な炎症反応等は見られなかった。埋植後 2 週

間後においては、肉眼的、光学顕微鏡的な所見はほぼ埋植 1 週間後と同様であったが、多孔性コラーゲン層には少し分解・吸収の形跡が見受けられた。埋植 4 週間後においては、肉眼的にはスポンジ層は一応残存が確認できるものの、分解・吸収が進んでいた。また不織布層は形状を保ってはいるものの、やはり若干分解・吸収が見られた。肉眼の観察では炎症反応は特に見受けられず、また線維状の癒痕も見られなかった。光学顕微鏡による観察では埋植周囲組織に極僅かに巨細胞の分布が見られた。以上の結果より、実施例 1 において作製されたコラーゲン膜は、ラット背部に埋植しても顕著な炎症反応、線維性癒痕はみられず、生体適合性が非常に良好であることが証明された。

【0040】

【発明の効果】本発明の医療用コラーゲン膜は、生体由来材料であるコラーゲンを主原料とし、不織布層と被膜層の積層構造からなる。そして、不織布層が医療用コラーゲン膜が有する縫合可能な膜強度、被膜層が生体適合性および組織再生促進性能の向上に関与し、従来の医療用コラーゲン膜の欠点であった縫合強度、十分な生体適合性および組織再生促進性能の不足を全て解決したものである。